RTS020

EBV Q-PCR Alert Kit

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

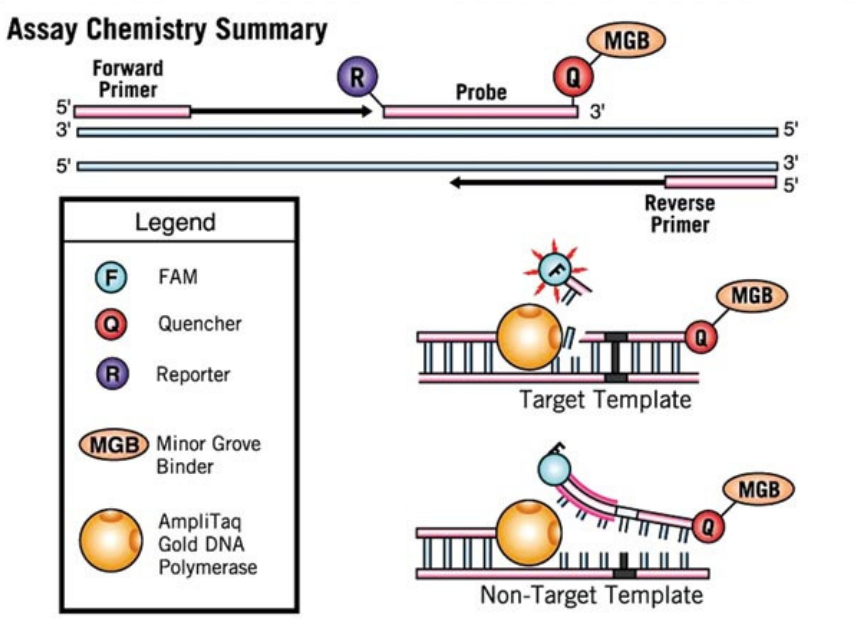
O kit **EBV Q-PCR Alert Kit** serve para teste quantitativo por amplificação dos ácidos nucleicos para a detecção e dosagem do DNA do Vírus Epstein-Barr de Herpes humana (EBV) em amostras de DNA extraídas do sangue total colhido em EDTA, suspensões de leucócitos, suspensões de linfomonócitos.

O produto é empregado, juntamente aos dados clínicos e a outros exames de laboratório, nos diagnósticos e no monitoramento da infecção da EBV.

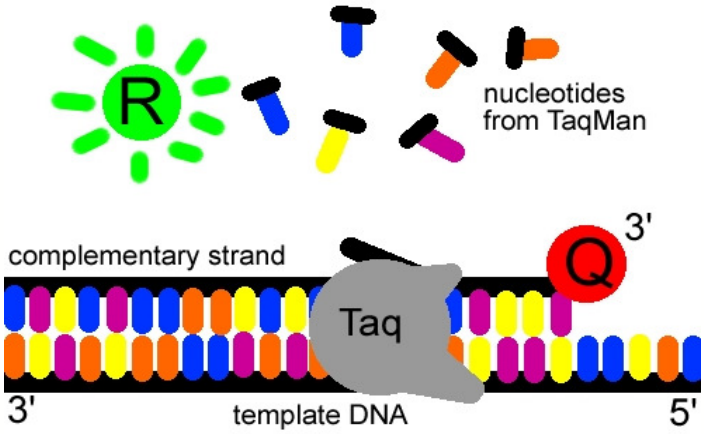
PRINCÍPIO DE AÇÃO E REAÇÃO

O procedimento envolve uma reação de amplificação em tempo real em microplaca, em um equipamento com termostato programável fornecido com sistema ótico de detecção fluorescente (RT-PCR = termociclador em tempo real).

Em cada poço, uma reação de amplificação é realizada para uma região do gene que codifica a proteína EBNA-1 do EBV e para uma região do gene da beta-globulina humana (com controle de inibição interno adequado à amostra) usando um DNA extraído de amostras a serem testadas. Uma probe específica para EBV, marcada com fluoróforo FAM, é ativada quando hibridizada com produto específico da reação de amplificação do EBV. Outra probe específica para o gene da beta-globulina humana, marcada pelo fluoroforo VIC, é ativada quando hibridizada com o produto da reação de amplificação para o gene da beta-globulina humana. A emissão fluorescente aumenta com o aumento da reação de amplificação do produto específico, e é medido e registrado pelo equipamento. A análise de dados torna possível determinar a presença e o título de DNA EBV na amostra inicial.



A partir do momento que a probe TaqMan® for ligada à parte específica do gabarito de DNA depois da desnaturação (alta temperatura) e resfriamento da reação, os primers se anelam ao DNA. A TaqPolimerase, então, adiciona nucleotídeos e remove a probe TaqMan® do DNA gabarito. Isso separa o quencher do repórter, e permite ao repórter emitir sua energia. Isso é, então, quantificado usando um computador. Quanto mais ocorrer a desnaturação e anelamento, mais oportunidades a TaqMan® terá de se ligar e, em contra partida, mais luz emitida será detectada.



O corante do repórter é liberado é liberado da dupla fita de DNA criada pela Taq Polimerase. Longe do corante quencher, a luz emitida do corante repórter dye em estado excitado pode agora ser observada.

A padronização do sistema foi realizado nos instrumentos da Applied Biosystems ABI PRISM série 7000.

COMPONENTES FORNECIDOS

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
EBV Q-PCR Alert AmpliMIX - RTS020-M	Mistura de primers de oligonucleotídeos	4 x 110 µL	Oligonucleotídeos, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100
EBV Q-PCR Alert AmpliPROBE - RTS020-P	Mistura de sondas fluorescentes marcadas com FAM / MGB-NFQ e com VIC / MGB-NFQ	4 x 110 µL	Oligonucleotídeos fluorescentes, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100
Q-PCR Alert AmpliMASTER - RTS000	Mistura de reagentes optimizados	4 x 340 µL	TRIS (base e cloridrato), Glicerol, $MgCl_2$, Desoriboxinucleotídeos trifosfatos, ROX, Uracil-N-glicosilase, Taq DNA polimerase hot start
	Microplaca com 96 pocinhos de 0,2 mL	3	Plástico PP
	Lâmina adesiva vedante	3	Plástico e cola

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

Equipamentos necessários:
- Capela de fluxo laminar.
- Agitador tipo Vórtex.
- Microcentrífuga de mesa (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas simples, volume variável.
- Real Time ABI PRISM 7000, completo com microcomputador.

Material de Consumo:
- EPI
- Ponteiras com filtro
- Água ultrapura
- Tubos de microcentrifugação (1,5mL a 2,0mL)

Amostras:
- DNA extraído por metodologia definida pelo usuário, seguindo as normas e padrões de amostras exigidos na descrição abaixo.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Componente	Referência modelo	Quantidade	Estocagem
EBV Q-PCR Alert AmpliMIX	RTS020-M	4 x 110 µL	-20°C
EBV Q-PCR Alert AmpliPROBE	RTS020-P	4 x 110 µL	-20°C
Q-PCR Alert AmpliMASTER	RTS000	4 x 340 µL	+ 2°C/+8°C
Microplaca para amplificação		3	Temp. ambiente
Lâmina adesiva para amplificação		3	Temp. ambiente

PRECAUÇÕES

Este kit é reservado para uso exclusivo em diagnóstico *in vitro*.

Manuseio: ao manusear o kit e as amostras, utilizar EPI adequado ao tipo de laboratório onde os testes serão realizados, devido à natureza da amostra (material biológico humano). Não beber ou comer na área de trabalho.

A área de trabalho deve ser um ambiente limpo e com ventilação adequada. Trabalhar dentro de capela de exaustão / fluxo laminar.

Não manusear o kit sem luvas.

Advertências e precauções gerais

Manipular e eliminar todas as amostras biológicas, reagentes e materiais usados como se fossem agentes infecciosos. Evitar o contato direto com as amostras biológicas. Evitar a formação de aerossol durante o procedimento – evitar respingar material ao redor da área de trabalho ou fora dela. O material que está em contato com as amostras biológicas deve ser tratado com Hipoclorito de sódio a 3 % pelo menos por 30 minutos ou ainda tratado em autoclave a 121°C durante uma hora antes de ser eliminado. O material descartável, se combustível, deve ser incinerado. Os resíduos líquidos que contém ácidos ou bases devem ser

neutralizados antes da eliminação.

Não pipetar nenhuma solução com a boca .

Lavar bem as mãos depois de haver manipulado as amostras e os reagentes.

Eliminar reagentes e resíduos conforme as normas vigentes.

Ler todas as instruções fornecidas no kit antes de realizar o teste.

Respeitar as instruções fornecidas no kit durante a execução do teste.

Respeitar a data de validade do kit.

Utilizar somente os reagentes presentes no kit e aqueles aconselhados pelo fabricante.

Não intercambiar reagentes procedentes de diferentes lotes.

Não utilizar reagentes procedentes de kits de outros fabricantes.

Advertências e precauções para a biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extração, a transcrição reversa, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos, requerem pessoal especializado para evitar o risco de resultados incorretos, em particular por causa da degradação dos ácidos nucleicos das amostras ou da contaminação das amostras por parte de produtos de amplificação.

É necessário dispor de uma área separada para a extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação/detecção dos produtos de amplificação (áreas de pré e pós-PCR). Nunca introduzir um produto de amplificação na área de extração/preparação das reações de amplificação.

É necessário uso de EPI adequado a cada uma das áreas de trabalho em laboratório de biologia molecular.

As amostras devem ser destinadas exclusivamente a este tipo de análise. As amostras devem ser manipuladas em uma câmara de fluxo laminar. Os tubos que contêm amostras diferentes nunca devem ser abertos ao mesmo tempo. As pipetas utilizadas para manipular as amostras devem ser destinadas exclusivamente a este uso. As pipetas devem ser do tipo deslocamento positivo ou com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os reagentes devem ser manipulados em câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de modo a ser utilizados em uma única vez. As pipetas utilizadas para manipular os reagentes devem ser destinadas exclusivamente para aquela área de trabalho. As pipetas devem ser do tipo de deslocamento positivo ou com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os produtos de amplificação devem ser manipulados de modo a limitar ao máximo a dispersão no ambiente para evitar a possibilidade de contaminações. As pipetas utilizadas para manipular os produtos de amplificação devem ser destinadas exclusivamente para sua área de trabalho.

Advertências e precauções específicas para os componentes

Os produtos EBV Q-PCR Alert AmpliMIX, EBV Q-PCR Alert AmpliPROBE, EBV Q-PCR AmpliSTANDARD, Q-PCR Alert AmpliMASTER, apresentam as seguintes advertências (S):

S 23-25. Não respirar vapores/aerossol. Evitar o contato com os olhos.

Observações importantes:

- Os tubos que contém o AmpliMIX e o AmpliPROBE são descartáveis e portanto devem ser utilizados uma única vez na preparação da mistura de reação.
- Os tubos que contém o AmpliSTANDARD® não podem ser congelados e descongelados por mais de 8 vezes. Ciclos sucessivos de congelamento / descongelamento podem causar perda na titulação.

- Os tubos que cont´sm o AmpliMASTER não podem ser congelados e descongelados por mais de 1 vez. Ciclos sucessivos de congelamento / descongelamento podem causar uma perda na eficiência da amplificação.

CUIDADOS COM A AMOSTRA BIOLÓGICA

A amostra deve ser tratada como potencialmente infecciosa.

Amostras

O material a ser usado com este kit precisa ser constituído de DNA extraído de amostras biológicas.

O sistema para extração de DNA da amostra inicial precisa fornecer DNA que é adequado para as reações de amplificação.

Quando amostras celulares biológicas são usadas, é recomendado não liberar uma quantidade de DNA genômico muito maior que aprox. 150.000 células (aprox. 1 µg) dentro da reação de amplificação com 5µL de DNA extraído, para prevenir a possibilidade de inibição.

As amostras biológicas a serem usadas para a extração de DNA precisam ser coletadas e armazenadas conforme descrito abaixo:

- sangue total coletado em EDTA precisa ser armazenado em 2-8°Cpor no máximo 3 dias;
- suspensões de leucócitos e linfomonócitos em solução fisiológica estéril ou PBS estéril precisa ser armazenado a 2-8°Cpelo prazo máximo de 4 horas.

É recomendado aliquotar as amostras em menores volumes em diversos frascos no sentido de prevenir ciclos repetitivos de congelamento e descongelamento.

Instruções para pré-tratamento de amostras clínicas, quando aplicável, e para a extração de DNA estão contidas no Manual de Instruções do kit <<EXTRAcell®>>.

Substâncias interferentes

O DNA extraído da amsotra inicial não deve conter heparina ou hemoglobina para poder previnir problema de inibição e a possibilidade de resultados inválidos frequentes.

Não há dados pertinentes a eventuais fenômenos de inibição por parte dos medicamentos antivirais, quimioterápicos ou imunosupressores.

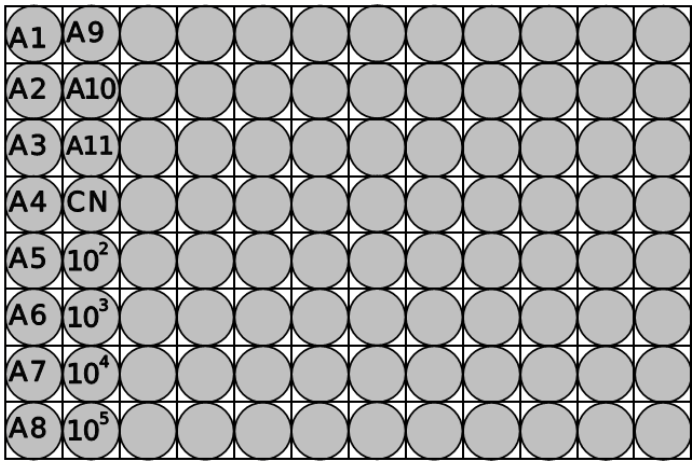
PROCESSO DE MEDIÇÃO

a) *Preparo da etapa de amplificação real time - área de pós-PCR:*
Antes de iniciar, consultar o manual do equipamento e:
- checar se RT-PCR está em condições de energizar os fluorófilos Fam e VIC das probes e se pode medir a emissão.
- ajustar a posição da microplaca de reação, o tipo de fluorescência que deve ser medida e o tipo de reação (amostra, controle negativo de amplificação, padrão com quantidade conhecida). Adicionar esta informação á planilha de trabalho que se encontra anexada a esta instrução de uso. A planilha deve ser cuidadosamente seguida durante a transferência das misturas de reação e das amostras em seus poços.

OBS.: para a determinação da quantidade de DNA alvo na amostra inicial, será necessário

preparar uma série de reações usando ***DNA padrões com quantidades conhecidas*** (cópias nas quantidades 10^5, 10^4, 10^3, 10^2) para que se possa obter a ***Curva Padrão***.

Ilustra-se a seguir, a título de exemplo, como pode ser organizada a análise de 11 amostras.



Significado: A1 - A11: Amostras para analisar; **CN**: Controle negativo de amplificação; **10^2**: Padrão 10^2 cópias; **10^3**: Padrão 10^3 cópias; **10^4**: Padrão 10^4 cópias; **10^5**: Padrão 10^5 cópias.

- Programar no termociclador os parâmetros do ciclo térmico e um volume de reação de 25 µL. Para equipamentos Applied Biosystems ABI PRISM™ da série 7000 escolher a opção "9600 emulation".

Ciclo térmico para amplificação		
Fase	**Temperaturas**	**Tempos**
Descontaminação	50°C	2 min.
Desnaturação inicial	95°C	10 min.
45 ciclos	95°C	15 seg.
	60°C	1 min.

b) Preparação da amplificação:

Antes de iniciar, é necessário:

- retirar e descongelar os tubos com as amostras para analisar. Centrifugar os tubos para que o material, após descongelamento, desça para o fundo do tubo, e mantê-los em gelo;
- retirar e descongelar os tubos de AmpliMIX necessários para o processo, lembrando que o conteúdo de cada tubo é suficiente para preparar 24 reações. Centrifugar os tubos por 5 segundos (pulso) para que os reagentes, após o descongelamento, que estejam na parede, desçam para o fundo do tubo, e mantê-los em gelo;
- retirar e descongelar um número de tubos de AmpliPROBE iguais aos dos tubos de AmpliMIX. Repetir o pulso nesses tubos para que seu conteúdo desça para o fundo do tubo. Mantê-los em gelo.
- retirar tantos tubos de AmpliMASTER quantos os tubos de AmpliMIX. Escrever “EBV” e a data no tubo com caneta com tinta permanente. Aplicar um pulso nos tubos para que os reagentes, depois de descongelados, desçam para o fundo do tubo. Mantê-los em gelo.

- retirar e descongelar os tubos de AmpliSTANDARD necessários. Aplicar um pulso nos tubos para que os reagentes, depois de descongelados, desçam para o fundo do tubo. Mantenha em gelo.
- se necessário, cortar a placa de amplificação para separar a parte que será utilizada no ensaio tomando o devido cuidado de manipulá-la com luvas (sem talco) e de não causar danos aos poços, durante o corte/separação.

1. Transferir 100 µL de AmpliMIX no tubo de AmpliMASTER. Misturar bem pipetando por três vezes o volume de 100 µL na mistura.
2. Transferir 100 µL de AmpliPROBE no tubo de AmpliMASTER. Misturar bem pipetando por três vezes o volume de 100 µL na mistura.
3. Misturar em Vortex a baixa velocidade por 5 segundos, evitando produção de espuma.
4. Centrifugar os tubos por 5 segundos (pulso) para que todo líquido escorra para o fundo do tubo.
5. Transferir 20 µL da mistura de reação obtida para o fundo de cada poço na placa de reação de amplificação, conforme pré-elaborado na planilha.

OBS.: Caso não seja utilizada toda a mistura de reagentes que foi elaborada, este tubo identificado como "EBV" poderá ser armazenado no escuro a -20°C por, no máximo, um mês, contanto que esta mistura seja congelada e descongelada somente uma vez.

6. Transferir, depositando-os cuidadosamente no fundo de seu respectivo poço, 5 µL de DNA extraído, conforme posição definida na planilha elaborada.
7. Transferir, depositando cuidadosamente no fundo do poço de controle negativo, 5 µL de água ultrapura.
8. Transferir, depositando-os cuidadosamente no fundo de seu respectivo poço, 5µL AmpliSTANDARD 10^2 cópias, conforme posição definida na planilha elaborada na mistura de reação. Proceder de igual modo, tomando-se o cuidado de dispensar cada qual em seu poço, 5 µL de AmpliSTANDARD com 10^3, 10^4, 10^5 cópias.
9. Fechar a Microplaca de amplificação com a Lâmina adesiva de amplificação, precavendo-se de que a placa fique bem selada, fazendo uso de acessório adequado para tal procedimento.
10. Transferir a placa de amplificação para o termociclador Real Time, que deve estar em área específica e destinada para produtos amplificados (pós PCR).

CALIBRAÇÃO DO PROCESSO

Para este tipo de ensaio e metodologia não existe procedimento de calibração para o processo de medição.

CÁLCULOS E OBTENÇÃO DOS RESULTADOS

Análise qualitativa dos resultados

Os valores registrados da fluorescência emitidos pela sonda específica para EBV (fluorescência FAM) e pela sonda específica para o controle interno (fluorescência VIC) nas reações de amplificação devem ser analisadas por software específico.

Antes de iniciar a análise é necessário:

- programar manualmente o "baseline" (nível de fundo fluorescente) do ciclo 6 ao ciclo 15*;

***Nota:** No caso de uma amostra positiva com alto título de DNA de EBV, a fluorescência FAM da sonda específica para EBV pode começar a aumentar antes do 15º ciclo. Neste caso o intervalo de cálculo da "baseline" deve ser adaptado do ciclo 6 ao ciclo em que a fluorescência FAM começar a aumentar.

- programar manualmente o Limiar (Thereshold) para a fluorescência FAM a 0,2;
- programar manualmente o Limiar (Thereshold) para a fluorescência VIC a 0,1.

Os valores de fluorescência emitidos pelas sondas específicas para EBV na reação de amplificação e o valor Threshold permite determinar o cT (ciclo Threshold), o ciclo em que a fluorescência atinge o valor Threshold.

Na reação de amplificação do controle positivo o valor de cT para a probe específica para EBV é usado para validar a amplificação e a detecção como descrito na tabela seguinte:

cT do Controle Positivo EBV (FAM)	Resultado do teste	Amplificação
cT ≤ 25	**POSITIVO**	**CORRETO**

Se o resultado da reação de amplificação do Controle Positivo é cT>25 ou indeterminado, a presença do DNA alvo não foi corretamente detectada. Isto significa que problemas podem ter ocorrido durante amplificação ou detecção, que podem ter levado a resultados incorretos. A sessão não é válida e precisa se repetida desde o passo de amplificação.

Quando este produto é usado para quantificação do DNA do EBV, utilizam-se as reações dos Standard ao invés do Controle Positivo. Neste caso a validação da reação é feita pelo Standard.

Na reação de amplificação do controle negativo, o valor de cT da probe específica para EBV é usado para validar a amplificação e a detecção como descrito na tabela a seguir:

Ct do Controle Negativo EBV (FAM)	Resultado do teste	Amplificação
Indeterminado	**NEGATIVO**	**CORRETO**

Se o resultado da reação de amplificação do Controle negativo é diferente de Indeterminado (Undetermined), a presença do DNA alvo foi detectado. Isso significa que problemas ocorreram na fase de amplificação (contaminação) que podem causar resultados incorretos e falsos positivos. A sessão não é válida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Na reação de amplificação de cada amostra, os valores de cT das sondas específicas EBV são usados para detectar a presença do DNA alvo, enquanto os valores de cT das sondas específicas do controle interno são usados para validar a amplificação, detecção e extração.

Verificar no software do instrumento que o cT foi determinado por um rápido e regular crescimento dos valores de fluorescência e não por picos ou incremento de sinal de fundo.

Este produto pode detectar uma quantidade mínima de aproximadamente 10 cópias do DNA do gene que codifica a proteína EBNA-1 do EBV por reação de amplificação, correspondente ao genoma Equivalente por reação.

Os resultados dos Cts são usados utilizados conforme descrito na tabela seguinte:

Reação da amostra		Adequação da amostra	Resultado do teste	DNA de EBV
EBV (FAM)	Beta-globina (VIC)			
Indeterminado	cT > 35 ou Indeterminado	Inadequado	Inválido	-
	cT ≤ 35	adequado	válido, negativo	NÃO DETECTADO
Determinado	cT > 35 ou Indeterminado	adequado *	válido, positivo	DETECTADO
	cT ≤ 35	adequado	válido, positivo	DETECTADO

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra é cT Indeterminado para a probe específica dO EBV e cT > 35 ou Indeterminado para a probe específica do controle interno, isso significa que não foi possível detectar de modo eficiente o DNA do controle interno. Neste caso, problemas ocorreram na fase de amplificação (amplificação não eficiente ou nula) ou na fase de extração (ausência de DNA, presença de inibidores ou amostras iniciais com um número de células insuficiente) que podem causar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o teste não é válido e deve ser repetido a partir da extração de uma nova amostra.

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra é cT Indeterminado para a probe específica do EBV e cT ≤ 35 para a probe específica do controle interno, o DNA do EBV não foi detectado no DNA extraído da amostra, mas não é possível descartar a presença do DNA de EBV a um título inferior ao limite de detecção do produto (verificar dados a seguir em Características de Desempenho). Neste caso o resultado seria um falso negativo.

Os resultados obtidos com este teste devem ser interpretados considerando todos os dados clínicos e os outros exames de laboratório relativos ao paciente.

Quando o DNA de EBV é detectado em uma amostra, o controle interno pode resultar em um cT >35 ou Indeterminado. De fato, a baixa eficiência na reação de amplificação para o Controle Interno pode ser deslocada pela competição com a alta eficiência da reação para o EBV. Neste caso a amostra é, contudo, adequada e o resultado positivo do teste é válido.

Análise quantitativa dos resultados

Depois de realizar o procedimento para análise qualitativa dos resultados, é possível realizar a análise quantitativa dos resultados de amostras positiva.

Os valores de cT para sondas específicas EBV para os quatro Standards são usados para calcular a curva padrão para a sessão de amplificação e para validar a amplificação e a detecção como descrito a seguir:

Curva Padrão EBV (FAM)	Faixa Aceitável	Amplificação / Detecção
Coeficiente de Correlação (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRETO

Se o valor do Coeficiente de correlação (R2) não está dentro dos limites, isso significa que problemas ocorreram na fase de amplificação ou de detecção (volumes de mistura de reação incorretos, degradação da sonda, degradação dos padrões, dispensação incorreta dos padrões, posicionamentop incorreto dos padrões, programação incorreta do ciclo térmico) que podem causar resultados incorretos. A sessão não é válida e deve ser repetida a partir da

fase de amplificação.

Os valores de fluorescência emitidos pela probe específica para EBV nas reações de amplificação de cada amostra e a Curva Padrão da sessão de amplificação são utilizados para calcular a Quantidade (Quantity) de DNA alvo presente nas reacções de amplificação das amostras.

Este kit está em condições de dosar entre 10 a 1,000,000 cópias de DNA do gene que codifica a proteína EBNA-1 do EBV por reação de amplificação, correspondente ao genoma Equivalente por reação.

Resultado da amostra EBV (FAM)	Genoma Equivalente de EBV por reação
Quantity > 1×10^6	**SUPERIOR A 1.000.000**
$1 \times 10^1 \leq$ Quantity $\leq 1 \times 10^6$	**= Quantity**
Quantity < 1×10^1	**INFERIOR A 10**

Os resultados (Quantity) de cada amostras são usados para calcular o genoma Equivalente de EBV presente na amostra extraída (Nc) de acordo com a fórmula:

$$Nc = \frac{Ve \times Quantity}{Vc \times Va \times Ee}$$

Onde:

- **Vc:** é a quantidade de amostra usada na extração (expresso em mL)
- **Ee:** é a eficiência da extração, expressa em décimos
- **Ve:** é o volume total do produto da extração, expresso em µL
- **Va:** é o volume do produto da extração usado na reação de amplificação, expresso em µL
- **Quantity:** é o resultado da reação de amplificação da amostra, expresso em gEq por reação

Quando o kit Extracell é usado, o DNA extraído de 500,000 células de acordo com as instruções de uso e resultado é requerido em gEq / 100,000 células, a fórmula fica:

Vc= 5 (500,000 células são equivalentes a 5 unidades de medição de 100.000 células)
Ee= 1,0 (significa eficiência de 100%)
Ve= 100 µL
Va= 5 µL

$$Nc\ (gEq\ /\ 100.000\ células) = \frac{100 \times Quantity}{5 \times 5 \times 1,0}$$

Nc (gEq / 100.000 células) = 4 x Quantity

Quando o kit Extracell é usado, e o resultado é requerido em gEq/extração, omitindo o termo Vc, a fórmula fica:

Vc= omitido Ee= 1.0 (significa eficiência de 100%) Ve= 100 µL Va= 5 µL $Nc\ (gEq\ /extração) = \frac{100 \times Quantity}{5 \times 1,0}$
Nc (gEq /extração) = 20 x Quantity

Cálculo de medição dos limites

Quando método particular de extração é usado, os limites de medição em gEq/mL da amostra devem ser calculado a partir do limite de medição linear da reação de amplificação, de acordo com as fórmulas:

$$\text{Limite inferior (gEq/extração)} = \frac{Ve \times 10\ gEq}{Vc \times Va \times Ee}$$

$$\text{Limite superior (gEq/extração)} = \frac{Ve \times 1{,}000{,}000\ gEq}{Vc \times Va \times Ee}$$

Quando o kit Extracell é usado a fórmula fica:

Limite inferior (gEq/mL) = 4 x 10 gEq
Limite superior (gEq/mL) = 4 x 1,000,000 gEq

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Usar somente DNA extraído das seguintes amostras humanas com este produto: sangue total colhido em EDTA, suspensões de leucócitos, suspensões de linfomonócitos.

Não utilizar com este produto o DNA extraído das amostras heparinizadas: A heparina inibe a reação de amplificação dos ácidos nucleicos e causa resultados inválidos.

Não utilizar com este produto DNA extraído contaminado com hemoglobina. Esta substância inibe a reação de amplificação dos ácidos nucleicos podendo causar resultados inválidos.

Não estão disponíveis dados pertinentes a eventuais fenomenos de inibição por parte dos medicamentos antivirais, quimioterápicos ou imuno-supressores.

Os resultados obtidos com este produto dependem de procedimentos corretos de coleta, transporte, conservação e preparação das amostras; para evitar resultados incorretos, é necessário, portanto, ter particular atenção durante estas fases e seguir atentamente as instruções fornecidas com os produtos para a extração dos ácidos nucleicos.

O método de amplificação Real Time dos ácidos nucleicos utilizados neste produto, por causa da sua elevada sensibilidade analítica, está sujeito à contaminação por parte das amostras clínicas positivas para o DNA de EBV, dos controles positivos e dos mesmos produtos

da reação de amplificação. As contaminações levam a resultados falsos positivos. A modalidade de realização do produto pode limitar as contaminações; mas estes fenômenos podem ser evitados somente com uma boa prática das técnicas de laboratório e seguindo atentamente as instruções fornecidas nestas Instruções de Uso.

Este produto requer pessoal instruído para as manipulações de amostras biológicas que podem transmitir agentes infecciosos e de reagentes classificados como perigosos para evitar incidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador ou outras pessoas.

Este produto requer roupa de trabalho (EPI) e área de trabalho adequadas à manipulação de amostras biológicas que podem transmitir agentes infecciosos e de reagentes classificados como perigosos para evitar incidentes com consequências potencialmente graves para o usuário ou outras pessoas.

Este produto requer pessoal instruído para o procedimento de biologia molecular, como a extração, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos para evitar resultados incorretos.

Este produto requer uma área separada para a extração/preparação das reacções de amplificação e para a amplificação/detecção dos produtos de amplificação para evitar resultados falsos positivos- áreas de pré e pós-PCR.

Este produto requer o uso de roupas de trabalho (EPI) e instrumentos destinados à extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação / detecção dos produtos de amplificação para evitar resultados falsos positivos.

Um resultado negativo obtido com este produto indica que o DNA de EBV não está detectado no DNA extraído da amostra mas não é possível descartar que o DNA de EBV esteja presente a uma titulação inferior ao limite de detecção do produto, neste caso o resultado será um falso negativo.

Como para qualquer outro dispositivo diagnóstico, os resultados obtidos com este produto devem ser interpretados considerando todos os dados clínicos e os outros exames de laboratório relativos ao paciente.

Como para qualquer outro dispositivo diagnóstico, existe um risco latente de obter resultados não válidos, falsos positivos e falsos negativos com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou reduzido posteriormente. Este risco residual, em situações particulares como os diagnósticos de urgência, pode contribuir a decisões incorretas com com consequências graves para o paciente.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Controle de Qualidade

É aconselhável confirmar o completo procedimento de análise de cada sessão, extracção e amplificação, utilizando uma amostra negativa e uma amostra positiva.

Como amostra negativa, utilizar uma amostra negativa para o DNA de EBV já testada ou da água bidestilada estéril.

Como amostra positiva, utilizar uma amostra positiva para o DNA de EBV já testado.

Controles de amplificação

É absolutamente necessário confirmar cada sessão de amplificação preparando uma reação de controlo negativo e uma reação de controle positivo.

Para o controle negativo, utilizar água bidestilada estéril (não incluída no kit) para acrescentar à reação no lugar do DNA extraído da amostra.

Para o controle positivo, utilizar o DNA obtido de uma amostra positiva já testada ou Q - EBV AmpliSTANDARD.

VALORES DE REFERÊNCIA OBTIDOS EM POPULAÇÕES SADIAS OU VALORES DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, ESTATÍSTICOS, DESEJÁVEIS, TERAPÊUTICOS OU TÓXICOS

Não existe este tipo de dado para a metodologia em questão.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO PRODUTO

Sensibilidade Analítica: Limite de Detecção – Detection Limit:

A sensibilidade analítica deste teste permite identificar a presença de aproximadamente 10 moléculas de DNA alvo nos 5 µL de DNA extraído e acrescentado à reação de amplificação.

Em termos de limite de detecção, a sensibilidade analítica do ensaio foi determinada utilizando um DNA de plasmídeo contendo o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida por espectrofotômetro. O DNA de plasmídeo foi diluído a um título de 10 cópias/5 µL em DNA genomico humano a um título de 500 ng/5 µL. Esta amostra foi empregada em 50 repetições para realizar a amplificação.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Amostras	N	Negativos	Positivos
10 cópias DNA plasmídico + 500 ng de DNA genômico humano	50	0	50

Sensibilidade analítica: Faixa de Medição Linear

A sensibilidade analítica deste teste, como Faixa de Medição Linear, permite determinar um título de 1.000.000 a 10 moléculas de DNA alvo nos 5 µL de DNA extraído e acrescentado à reação de amplificação.

Em termos de Faixa de Medição Linear, a sensibilidade analítica do teste foi determinada utilizando um painel de diluições (1 $\log_{10}$ entre uma diluição e a seguinte) de DNA de plasmídeo contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida por espectrofotômetro. Os pontos do painel de 10^7 moléculas por reação a 10^1 moléculas por reação foram empregadas em 9 repetições para realizar a amplificação. A análise dos dados obtidos, realizada através de regressão linear, demostrou que o teste apresenta uma resposta linear para todos os pontos do painel (coeficiente de correlação linear superior a 0,99).

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte.

Faixa de Medição Linear		
	Cópias DNA / reação	gEq / 100.000 células
Limite superior	1.000.000	4.000.000
Limite inferior	10	40

***** O limite superior da Faixa de Medição Linear como gEq/reação foi fixado a 10^6 moléculas/reação, dentro de um logaritmo do valor de mais alta concentração do padrão de amplificação **AmpliSTANDARD** (10^5 moléculas/reação).

****** O limite inferior da Faixa de Medição Linear foi fixado em 10 moléculas/5 µL, dentro de um logaritmo de concentração mais baixo do padrão de amplificação AmpliSTANDARD (10^2moléculas / 5 µL).

Sensibilidade analítica: Precisão

O estudo da precisão do teste, entendido como variabilidade dos resultados obtidos com diferentes repetições de uma amostra com mesma concentração analisada durante uma mesma sessão, permitiu determinar um Coeficiente de Variação (CV %) de 15,4% dentro de uma faixa linear de 10^6 moléculas/5 µL a 10 moléculas/5 µL.

Sensibilidade analítica: Exatidão

O estudo da exatidão do teste, que é a diferença entre os resultados médios obtidos em uma única sessão em diferentes repetições de uma amostra com a mesma concentração e o valor teórico de concentração da amostra, permitiu determinar uma inexatidão média de 9,5% dentro de uma faixa linear de 10^6 moléculas/5 µL a 10 moléculas/5 µL.

Sensibilidade diagnóstica: eficiência de detecção nos diferentes genótipos / subtipos

A sensibilidade diagnóstica do teste, como eficiência de detecção nos diversos genótipos /subtipos, foi avaliada pelo coparação de sequências com banco de dados de nucleotídicos.

O exame do alinhamento das regiões selecionadas para a hibridização dos primers de oligonucleotídeos do AmpliMIX e da sonda fluorescente AmpliPROBE com as sequências disponíveis no banco de dados do gene que codifica a proteína EBNA-1 de EBV demonstrou sua conservação e a ausência de mutações significativas.

Sensibilidade diagnóstica: amostras positivas

A sensibilidade diagnóstica do teste, confirmando amostras clínicas positivas, foi testada usando um número de amostras de sangue total positivas para DNA EBV commo material de referência e o resultado foi maior que 90%.

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada usando quatro amostras de sangue total coletado em EDTA que era positivo para DNA de EBV. Cada amostra foi usada em duas repetições para realizar o procedimento completo de análise, extração e amplificação.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Amostra	DNA de EBV	TESTE 1 gEq / 100.000 células	TESTE 2 gEq / 100.000 células
Pos. 01	+	< 40 (4)	< 40 (16)
Pos. 02	+	< 40 (12)	< 40 (4)
Pos. 03	+	< 40 (36)	44
Pos. 04	+	3.668	3.780
Pos. 05	+	580	336
Pos. 06	+	1.240	1.176
Pos. 07	+	492	536
Pos. 08	+	5.112	5.512
Pos. 09	+	1416	824
Pos. 10	+	não detectado	< 40 (8)

Nota: A amostra 10 foi negativa de uma das duas repetições porque sua carga viral estava abaixo do limite de detecção de EBV de 10 gEq/reação ou 40 gEq/100.000 células.

Especificidade analítica: marcadores interferentes em potencial

A especificidade analítica do teste, que é a reação cruzada com outros marcadores interferentes em potencial, foi avaliada por comparação de sequências com bancos de dados de nucleotídicos.

O exame do alinhamento das regiões selecionadas para a hibridização dos primers de oligonucleotídeos do AmpliMIX e da sonda fluorescente AmpliPROBE com as sequências disponíveis no banco de dados de organismos diferentes que o EBV, incluíndo o genoma completo do HHV8, o virus de herpes humana que é mais similar ao EBV, mostrou a sua especificidade e a ausência de homologias significativas.

Especificidade diagnóstica: amostras negativas

A especificidade diagnóstica do teste, como confirmação das amostras clínicas negativas, foi testada analisando um número de amostras de sangue total negativos para o DNA de EBV e o resultado foi maior que 90%.

A especificidade diagnóstica foi avaliada utilizando uma série de 10 amostras de sangue total coletado em EDTA que eram negativos para o DNA de EBV. Cada painel de amostra foi usado para realizar o procedimento completo de análise, extração e amplificação.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Amostras	N	Negativos	Positivos
Leucócitos de sangue total	10	10	0

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERLE S. W., et al (2002) *J Clin Virology* 25: S79 - S85

IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

Biometrix Diagnóstica Ltda.
Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba - PR
CEP: 82840-360
Tel.: (41) 2108-5250
Fax: (41) 2108-5252
DDG: 0800-7260504
E-mail: biometrix@biometrix.com.br
Website: www.biometrix.com.br
CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.
C.so Torino, 89/d - 10090 Buttigliera Alta (TO) - Itália

REGISTRO ANVISA

RTS076-M: 80298490100
RTS076-P: 80298490040

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovado por:

24/12/2013

X

Maurício Cichon
Laboratório
Assinado por: Maurício Cichon

STD020

EBV Q – PCR Standard

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O produto «**EBV Q - PCR Standard**» é destinado ao uso como um controle positivo e como padrão de quantidade conhecida de DNA para obter uma curva padrão em ensaios de amplificação em tempo real para **detecção e dosagem do DNA do EBV** com os produtos «**Q - PCR Alert AmpliMASTER**», «**EBV Q - PCR Alert AmpliMIX**» e « **EBV Q - PCR Alert AmpliPROBE**» da Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto **Q - PCR Standard** inclui, quatro soluções de plasmídeos estabilizadas com titulação conhecida contendo a sequências requeridas, divididas em dois tubos de alíquotas prontas para uso.

O procedimento envolve o uso do **Q - PCR Standard** na reação de amplificação em tempo real específica para uma região gênica que codifica a proteína EBNA-1 do **EBV**. A detecção do produto específico durante a reação de amplificação em tempo real confirma a habilidade de identificar a presença do DNA do **EBV** e permite o cálculo da curva padrão.

O kit possibilita a execução de 16 sessões de análise separadas.

* A concentração inicial do padrão foi determinada por espectrofotômetro, pela medição da absorção da preparação inicial de DNA de plasmídeo.

MATERIAIS FORNECIDOS

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
EBV Q - PCR Standard 10^5	Solução de plasmídeo em tubo com tampa vermelha	**2 x 50 µL**	Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura
EBV Q - PCR Standard 10^4	Solução de plasmídeo em tubo com tampa azul	**2 x 50 µL**	Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura
EBV Q - PCR Standard 10^3	Solução de plasmídeo em tubo com tampa verde	**2 x 50 µL**	Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura
EBV Q - PCR Standard 10^2	Solução de plasmídeo em tubo com tampa amarela	**2 x 50 µL**	Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura

- Armazenar a -20°C ou inferior.

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

- Fluxo laminar.
- Luvas descartáveis sem talco.
- Agitador vórtex.
- Microcentrífuga de bancada (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas estéreis e ponteiras com filtro ou deslocamento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Água bidestilada estéril.
- Real Time ABI PRISM 7000, completo com computador.

ACESSÓRIOS

Os reagentes otimizados para amplificação, os primers (oligonucleotídeos) e os reagentes de detecção (probes fluorescentes) não estão inclusas neste produto. Para realizar estes passos analíticos, os produtos a seguir são recomendados:

- «**Q - PCR Alert AmpliMASTER**» (RTS000), combinação de reagentes otimizados, microplacas e adesivos para PCR em tempo real e determinação alélica; total de 96 reações.
- « **EBV Q - PCR Alert AmpliMIX**» (RTS020-M), primers oligonucleotídeos para PCR em tempo real; total de 96 reações.
- « **EBV Q - PCR Alert AmpliPROBE**» (RTS020-P), probes fluorescentes para PCR em tempo real; total de 96 reações.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Este produto é exclusivamente para uso *in vitro*.

Advertências e precauções gerais

Manusear e descartar todas as amostras biológicas como potencialmente infecciosas. Evitar o contato direto com amostras biológicas. Evitar respingos. Os materiais que entram em contato com amostras biológicas devem ser tratados com hipoclorito de sódio 3% por, no mínimo, 30 minutos, ou autoclavados a 121°C por uma hora antes de serem descartados.

Manusear e descartar todos os reagentes e materiais como potencialmente infecciosos. Evitar contato direto com reagentes. Evitar respingos. Os resíduos devem ser tratados e descartados de acordo com normas de segurança. Resíduos líquidos contendo ácidos ou bases devem ser neutralizados antes do descarte. Usar jaleco, luvas e óculos de proteção.

Nunca pipetar soluções com a boca.

Não comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos dentro da área de trabalho.

Lavar as mãos cuidadosamente após manusear amostras e reagentes.

Descartar as sobras de reagentes e resíduos de acordo com as normas de segurança. Ler as instruções de uso antes de utilizar o produto. Seguir as instruções.

Não usar produtos após o prazo de validade estabelecido.

Somente usar os reagentes fornecidos no kit e aqueles recomendados pelo fabricante.

Não misturar reagentes de diferentes lotes.

Não utilizar reagentes de outros fabricantes.

Advertências e precauções de biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extração, a transcrição reversa, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos requerem pessoal especializado para prevenir o risco de resultados incorretos, em particular devido à degradação dos ácidos nucleicos das amostras ou devido a contaminação das amostras por produtos de amplificação.

É necessário dispor de uma área separada para a extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação/detecção dos produtos de amplificação (áreas de pré e pós-PCR). Nunca introduzir um produto de amplificação na área de extração/preparação das reações de amplificação.

É necessário uso de EPI adequado a cada uma das áreas de trabalho em laboratório de biologia molecular. Nunca transfira materiais da área de amplificação/detecção para a área de extração/preparação de reações.

As amostras devem ser empregadas exclusivamente a este tipo de análise. As amostras devem ser manipuladas em uma câmara de fluxo laminar. Os tubos que contêm amostras diferentes nunca devem ser abertos ao mesmo tempo. As pipetas utilizadas para manipular as amostras devem ser destinadas exclusivamente a este uso. As pipetas devem ser do tipo deslocamento positivo ou com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os reagentes devem ser manipulados em câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de modo a ser utilizados em uma única vez. As pipetas utilizadas para manipular os reagentes devem ser destinadas exclusivamente a este propósito. As pipetas devem ser do tipo de deslocamento positivo ou com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os produtos de amplificação devem ser manipulados de modo a limitar ao máximo a dispersão no ambiente para evitar a possibilidade de contaminações. As pipetas utilizadas para manipular os produtos de amplificação devem ser destinadas exclusivamente para sua área de trabalho.

Advertências e precauções para componentes específicos

Os tubos contendo **Q - PCR Standard** podem ser congelados e descongelados por no máximo 8 vezes. Um número maior de ciclos de congelamento e descongelamento pode causar uma redução do título.

Q - PCR Standard apresenta as seguintes advertências (S):

S 23-25 Não inalar vapores. Evitar contato com os olhos.

PROCEDIMENTO

O produto « **EBV Q - PCR Standard**» deve ser usado com a mistura de reação obtida com os produtos «**Q - PCR Alert AmpliMASTER**», « **EBV Q - PCR Alert AmpliMIX**» e « **EBV Q - PCR Alert AmpliPROBE**».

Q - PCR Standard está pronto para o uso, portanto deve ser usado adicionando 5µL diretamente na mistura de reação.

O procedimento completo envolve preparação e execução de reação de amplificação em tempo real em uma microplaca com termociclador com sistema ótico de detecção de fluorescência. É descrito em detalhes nas instruções de uso dos produtos « **EBV Q - PCR Alert AmpliMIX**», bem como informações sobre as características de desempenho e limitações do procedimento.

Nota: Q - PCR Standard pode ser congelado e descongelado por no máximo 8 vezes. Um número maior de ciclos de congelamento e descongelamento pode causar uma redução do título.

REFERÊNCIAS

ABERLE S. W., et al (2002) J Clin Virology 25: S79 - S85

IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

Biometrix Diagnóstica Ltda.
Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba - PR
CEP: 82840-360
Tel.: (41) 2108-5250
Fax: (41) 2108-5252
DDG: 0800-7260504
E-mail: biometrix@biometrix.com.br
Website: www.biometrix.com.br
CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.
C.so Torino, 89/d - 10090 Buttigliera Alta (TO) - Itália

REGISTRO ANVISA

80298490053

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovado por:
24/12/2013

X

Maurício Cichon
Laboratório
Assinado por: Maurício Cichon

WORKSHEET

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

ATTACHMENT